

- (4);240-242.
- 19 王树声,向松涛,陈志强,等.复杂性上尿路结石的微创综合治疗[J].中华泌尿外科杂志,2005,26(8):239-241.
- 20 孙西钊,叶章群.尿路结石的药物排石疗法[J].中华泌尿外科杂志,2007,28(3):212-212.
- 21 Gravina G L, Costa A M, Ronehi P, et al. Tamsulosin treatment increases clinical success rate of single extracorporeal shock wave lithotripsy of renal stones[J]. Urology, 2005, 66(1):24-28.
- 22 Kupeli B, Irkilata L, Gurocak S, et al. Does tamsulosin enhance lower ureteral stone clearance with or without shock wave lithotripsy[J]? Urology, 2004, 64(6):1111-1115.
- 23 张泽,李逊,吴开俊,等.计算机尿石症预防饮食管理软件的刊发[J].中华泌尿外科杂志,2006,27(11):782-784.
- 24 张泽,李逊,吴开俊,等.尿石症预防饮食管理软件管理肾结石患者饮食摄入的应用价值[J].中华泌尿外科杂志,2007,28(3):186-188.
- 25 何群,张晓春,那彦群.284例泌尿系结石成分分析与代谢评价[J].中华泌尿外科杂志,2005,26(11):761-764.
- 26 林宗明,方银忠,张永康,等.维拉帕米和超氧化物歧化酶对体外冲击波肾损伤保护作用[J].中华泌尿外科杂志,2003,24(2):93-95.
- 27 江宏恩,张祖豹,吴瑜璇.两种钙离子拮抗剂对ESWL时保护肾功能的初探[J].中华泌尿外科杂志,1997,18(3):157-159.
- 28 廖勇彬,黄齐旺,黄晓生,等.人总皂甙对高能冲击波肾的保护作用[J].中华泌尿外科杂志,1998,19(6):309.
- 29 盛斌武,贺大林,陈兴发,等.黄芪对高能冲击波致肾损伤保护性作用的实验研究[J].中华泌尿外科杂志,2004,25(3):159-116.

(收稿日期:2012-12-23)

基因治疗在下尿路功能障碍治疗中的应用现状*

田钰¹ 廖利民^{1△} 陈国庆¹

〔摘要〕 下尿路功能障碍可由中枢和外周神经系统以及尿路上皮和逼尿肌的病变导致。随着人们对下尿路研究的不断深入,临床上出现多种治疗下尿路功能障碍的新方法和新药物,但是对症状严重的患者效果仍不尽如人意。基因治疗为下尿路功能障碍的治疗提供了一种全新的途径。本文对目前国内外基因治疗在下尿路功能障碍的应用及基因导入载体的种类和优缺点进行综述。

〔关键词〕 下尿路功能障碍;基因治疗;间质性膀胱炎;膀胱过度活动症

〔中图分类号〕 R694 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1001-1420(2013)08-0636-04

Application of gene therapy in lower urinary tract dysfunction

TIAN Yu LIAO Limin CHEN Guoqing

(Capital Medical University School of Rehabilitation Medicine; Department of Urology, Beijing Charity Hospital, China Rehabilitation Research Centre, Beijing, 100068, China)

Corresponding author: LIAO Limin, E-mail: lmliao@263.net

Abstract Lower urinary tract dysfunction is caused by pathophysiological alterations of central and peripheral nervous systems, as well as urothelium and detrusor. Recent researches have increased treatment options thus many new medical care and drugs have emerged for lower urinary tract symptoms. Nevertheless, doctors still experience refractory cases. Gene therapy offer a new therapeutic approach. In this article, we review the current status of gene therapy for lower urinary tract dysfunction and the advantages and disadvantages of gene delivery systems.

Key words lower urinary tract dysfunction; gene therapy; interstitial cystitis; overactive bladder

基因治疗是一种将某些遗传物质转移到患者体内,使其在体内表达,最终达到改善细胞功能和(或)治疗某种疾病的方法。由于基因治疗的有效

性和安全性存在问题,因此以往主要用于治疗威胁人类生命的疾病和缺少常规治疗方法的先天性或后天性疾病。影响基因治疗有效性和安全性的两个主要因素是基因转移系统和靶细胞。随着新的基因导入载体的出现,基因治疗效率和安全性得到提升,临床试验范围也扩大到了治疗风湿性关节炎、神经系统疾病、视神经炎、帕金森综合症、下尿路功能障碍等疾病。

* 基金项目:国家十二五科技支撑计划项目(编号 2012BA134B02),国家自然科学基金资助项目(81270847,81070607)

¹首都医科大学康复医学院,中国康复研究中心北京博爱医院泌尿外科(北京,100068)

[△] 审校者

通信作者:廖利民, E-mail: lmliao@263.net

自从1990年美国食品与药物管理局(FDA)正式批准第一个基因治疗临床试验以来,全球进行了约1 785例基因治疗临床试验。其中治疗恶性肿瘤的实验占到了首位,约为1 155例,治疗单基因疾病151例,心血管疾病150例,传染性疾病142例,神经系统疾病36例,眼科疾病26例。目前只有一个基因治疗临床试验用于治疗下尿路疾病,该试验是评价基因治疗膀胱过度活动的效果。上述临床试验中,424例的基因导入载体为腺病毒,逆转录病毒365例,裸/质粒DNA337例,牛痘病毒146例,脂质体110例,痘病毒95例,腺病毒相关病毒86例,单纯疱疹病毒(HSV)58例。其中63例试验进入临床Ⅲ期,2例进入临床Ⅳ期。

随着人们对下尿路研究的不断深入,临床上出现了多种组织选择性高的新药,但对于症状较重的患者,药物缓解症状程度有限。基因治疗可以从多层次、多方面提供新的解决方法和途径,将为临床提供更有效的治疗方法。本文对目前国内外文献中的基因治疗在下尿路疾病的应用及基因导入载体的种类和优缺点进行综述。

1 抑制性神经递质

1.1 γ -氨基丁酸

γ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统一种重要的抑制性神经递质。生物体内的GABA由谷氨酸脱羧酶(GAD)催化谷氨酸脱羧生成。GAD是生成GABA的关键酶,研究发现脊髓损伤的动物骶髓和膀胱传入神经的GAD表达水平降低。Miyazato等^[1]还发现向逼尿肌过度活动的大鼠膀胱灌注GABA受体拮抗剂后,大鼠的逼尿肌过度活动明显减少。随后,Miyazato等^[2]将携带编码GAD基因的HSV注入大鼠膀胱壁,发现膀胱传入通路及骶髓GABA水平上升,逼尿肌过度活动抑制。此外,该实验表明:该基因治疗的方法可以显著降低大鼠尿道压,增加排尿期膀胱收缩力,缓解了逼尿肌-括约肌协同失调^[3]。上述研究说明,单纯疱疹病毒携带编码GAD基因的治疗方法可能会成为一种治疗逼尿肌过度活动及逼尿肌-括约肌协同失调的新方法。

1.2 阿片类药物

阿片肽(包括内啡肽、脑啡肽、强啡肽等)有限制炎症扩大和缓解疼痛等作用。阿片类药物模拟内阿片肽,与不同部位的阿片受体结合发挥镇痛作用,在临床上应用广泛。由于阿片类药物强大的镇痛作用,常用来缓解间质性膀胱炎(IC)患者剧烈、顽固、反复的耻骨上区疼痛等症状,但阿片类药物极易产生耐药性,为了维持原有的药效,必须反复用药并不断加大用量而导致药物滥用,进而产生依赖。

脑啡肽属于内源性阿片类药物,在大脑、脊髓、

膀胱传入和传出通路表达,有抑制尿频的作用,在骶髓注射外源性的脑啡肽或阿片类药物可以抑制大鼠的膀胱收缩。随后有学者将携带编码脑啡肽的HSV注射于灌注过辣椒素大鼠的膀胱壁,HSV成功感染膀胱组织,膀胱组织脑啡肽水平也升高,抑制了膀胱过度活动症(OAB),减轻了膀胱疼痛,同时没有影响大鼠正常排尿^[4]。这些研究使人们对阿片类药物有了更深的了解,同时为临床医师治疗OAB和IC提供了新的思路。

人阿黑皮素原(POMC)基因可以编码 β -内啡肽和内源性阿片肽,通过激活感觉神经 μ -阿片受体从而缓解疼痛。Chuang等^[5]给实验组大鼠膀胱壁注射阿黑皮素基因后再膀胱灌注乙酸,大鼠只出现了轻度的OAB,随后注射阿片类受体拮抗剂纳洛酮,膀胱过度活动较前加重。

所以说,以升高膀胱组织阿片类药物水平为目的的基因治疗可应用于治疗膀胱敏感性增加和伴膀胱疼痛的疾病。

2 生长因子

2.1 神经生长因子

神经生长因子(NFG)是促进神经细胞生长、分化的一类蛋白质因子,由敏感神经元的靶组织释放,逆向转运至细胞体,引起神经元形态学差异、促进神经再生、刺激神经递质表达等生理特征,对于维持膀胱正常感觉及交感神经功能必不可少。在下尿路,NFG由尿路上皮及平滑肌细胞产生,由神经轴突传递至背根神经节(Dorsal root ganglion),参与调节神经分化。糖尿病患者NGF缺乏或减少,会使逆向运输至神经元的NFG减少。有研究表明,补充NFG的方法对治疗糖尿病膀胱有效,但为改善膀胱功能而以全身给药的方式补充NFG的方法可能对身体多器官产生严重的副作用。

Sasaki等^[6]在大鼠膀胱灌注链脲霉素,造成糖尿病膀胱,实验组大鼠膀胱壁注射编码 β -NGF基因的单纯疱疹病毒,4周后研究者不仅在膀胱壁发现目的基因,还在腰骶部的背根神经节发现目的基因。实验结果表明:实验组大鼠对痛觉的敏感性未增加,膀胱容量、剩余尿量减少,提示基因治疗改善膀胱感觉,而对照组的膀胱容量、剩余尿量增加。

与糖尿病患者相反,OAB和IC患者的尿液NFG水平升高^[7]。伴OAB的BPH者尿液NFG水平也显著升高,当出口梗阻解除后,NFG浓度下降^[8]。OAB大鼠的膀胱组织表达NFG的mRNA也是增加的。Chuang等^[9]还发现在大鼠膀胱腔内灌注NFG引起膀胱过度活动,因此,NFG水平与膀胱过度活动有密切关系。结合TAT蛋白的戊糖核酸(PNA-TAT)是NFG的拮抗剂,Tyagi等^[10]给大鼠膀胱腔内灌注PNA-TAT可以显著缓解因膀胱炎引起的OAB。因此,通过基因治疗

减少 NFG 的生成很有可能成为抑制 OAB 的新方法。

2.2 肝细胞生长因子

肝细胞生长因子(HFG)参与多种细胞有丝分裂,通过促进血管生成,抗细胞凋亡,阻止组织纤维化。器官或组织损伤后,胶原蛋白和其他细胞外基质出现病理性积累,过多的细胞外基质会导致器官纤维化,影响器官正常功能。膀胱出口梗阻会导致膀胱组织的 HFG 水平升高,细胞外基质异常积累,这种病理的纤维化影响平滑肌的收缩,并最终导致膀胱容量减小。Ku 等发现,在大鼠膀胱壁注射含表达 HFG 的裸 DNA 后,膀胱组织 HGF 水平升高,HGF 起到了抑制转化生长因子- β_1 的 mRNA 转录及其蛋白表达,降低了膀胱壁胶原的含量,使膀胱容量增大,膀胱过度活动减少^[11]。

3 细胞因子

目前有关 IC 病因的假说有感染、肥大细胞增多、神经源性病因、缺氧、尿液中抗增殖因子的增加、自体免疫等^[12]。IC 患者膀胱组织和尿液中 IL-2、IL-6、IL-8 和 TNF- α 显著增加,提示这些细胞因子可以作为 IC 的特异性标志物^[13,14]。TNF- α 是促炎递质,促进免疫系统产生炎症反应,诱导其他细胞因子的产生,活化和表达粘附分子,刺激和促进炎性细胞聚集。此外, Svensson 等^[15]发现 TNF- α 抗体可以缓解炎症性疼痛和神经性疼痛。

IL-4 是典型的抗炎细胞因子,能阻断炎症因子释放。与 TNF- α 和 IL-6 相反,IC 患者尿液中 IL-4 减少,使用抗过敏药物甲磺司特治疗后,患者尿中 IL-4 水平升高^[16]。研究表明,在大鼠足底皮下注射携带编码 IL-4 基因的 HSV,IL-4 在大鼠体内成功表达,疼痛症状缓解^[17]。

大鼠膀胱腔内灌注仙人掌毒素后,引起膀胱上皮损伤,出现疼痛和尿频,膀胱 TNF- α mRNA 水平升高。TNFasR 基因的产物可以中和 TNF- α 作用。Funahashi 等^[18]将携带 TNFasR 基因的 HSV 注入大鼠膀胱壁后,膀胱组织的 TNF- α 水平降低,大鼠疼痛症状和尿频缓解。

因此,产生细胞因子的基因疗法可以用来治疗 IC 等疾病。

4 锰超氧化物歧化酶

盆腔器官的放射治疗诱导机体形成的超氧自由基,破坏膀胱黏膜上皮,损伤膀胱组织,造成放射性膀胱炎。锰超氧化物歧化酶可以消除线粒体中过量的超氧自由基,稳定线粒体膜,阻止线粒体膜去极化,释放细胞色素 c 和激活的蛋白酶,阻止细胞凋亡^[19]。肺部及食管的锰超氧化物歧化酶还可以起到预防射线对肺部和食管造成损伤的作用^[20]。

Kanai 等^[21]以膀胱灌注的方式使含编码锰超

氧化物歧化酶基因的质粒转染尿路上皮,灌注 48 小时后,锰超氧化物歧化酶基因在机体表达,使得射线照射后的尿路上皮很快恢复,而对照组恢复时间较长。此外,实验组大鼠在灌注 6 个月后,逼尿肌功能优于对照组。因此,我们认为膀胱灌注含编码锰超氧化物歧化酶基因的质粒转染尿路上皮的方法可以预防和治疗放射性膀胱炎。

5 Maxi-K 通道

神经和(或)肌肉过度兴奋可以导致膀胱过度活动。有研究表明,参与肌细胞的调节收缩和舒张的钾离子通道开放减少后,可以抑制膀胱过度活动,尤其抑制对不同肌细胞的调节收缩和舒张有重要作用的 Maxi-K 通道,使得膀胱过度活动症状明显缓解。其机制是当细胞激活时,Maxi-K 通道开放,钾离子从细胞内流向细胞外,细胞发生超极化,降低了 L-型电压依赖性钙通道的活性,导致流入细胞内的钙离子减少,细胞内钙离子浓度降低,导致肌肉收缩力减弱。Christ 等^[22]根据该机制,膀胱壁注射 hSlo/pcDNA 抑制 Maxi-K 通道的活性,抑制了因膀胱出口梗阻造成的 OAB。

6 基因导入载体

6.1 病毒载体

病毒载体在基因治疗领域应用广泛,包括各种逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘病毒等。这些病毒载体有各自的优点,同时也存在各自的局限性。

逆转录病毒能够选择性感细胞并整合到宿主细胞 DNA 上、长期存在于宿主基因组中等特点,使之成为第一个利用病毒进行基因转移的工具。但是,外源基因随机插入,可能导致突变^[23]。

腺病毒载体是基因治疗中最常用的病毒载体,它具有包装容量大、制备方便、易纯化和浓缩、宿主范围广、感染效率高等特点^[24]。但第一代腺病毒外源基因表达时间短,免疫原性较强,高滴度时有明显的细胞毒性等。通过对其改造,产生了许多更安全、更有效的腺病毒载体,如无病毒基因的无肠型腺病毒载体、靶向性病毒载体、复制型腺病毒等。

腺相关病毒(AAV)以不致病、宿主范围广、能够感染分裂与非分裂的细胞、能插入到宿主细胞染色体或染色体外串联体 DNA 的形式长期稳定表达等优点,被认为是目前最安全、有效的载体^[25]。

6.2 非病毒载体

在基因治疗临床试验中,由于非病毒系统导入效率低,所以使用范围较小。但非病毒载体的生物安全性好,特别是靶向性的脂质体、靶向性的多聚物以及脂质体等,结合电脉冲、超声等技术,可以明显提高导入效率^[26]。

总之,基因治疗在实验室和临床试验取得了令

人鼓舞的结果。随着基因治疗安全性的增加,越来越多的基因治疗进入到I期临床试验。我们相信,在不远的将来,基因治疗会成为治疗下尿路功能疾病的新方法。

[参考文献]

- 1 Miyazato M, Sasatomi K, Hiragata S, et al. GABA receptor activation in the lumbosacral spinal cord decreases detrusor overactivity in spinal cord injured rats[J]. J Urol, 2008, 179(3):1178-83.
- 2 Miyazato M, Sugaya K, Goins W F, et al. Herpes simplex virus vector-mediated gene delivery of glutamic acid decarboxylase reduces detrusor overactivity in spinal cord-injured rats[J]. Gene Ther, 2009, 16(5):660-668.
- 3 Miyazato M, Sugaya K, Saito S, et al. Suppression of detrusor-sphincter dyssynergia by herpes simplex virus vector mediated gene delivery of glutamic acid decarboxylase in spinal cord injured rats[J]. J Urol, 2010, 184(3):1204-1210.
- 4 Yokoyama H, Sasaki K, Franks M E, et al. Gene therapy for bladder overactivity and nociception with herpes simplex virus vectors expressing preproenkephalin[J]. Hum Gene Ther, 2009, 20(1):63-71.
- 5 Chuang Y C, Chou A K, Wu P C, et al. Gene therapy for bladder pain with gene gun particle encoding pro-opiomelanocortin cDNA[J]. J Urol, 2003, 170(5):2044-2048.
- 6 Sasaki K, Chancellor M B, Goins W F, et al. Gene therapy using replication-defective herpes simplex virus vectors expressing nerve growth factor in a rat model of diabetic cystopathy[J]. Diabetes, 2004, 53(10):2723-2730.
- 7 Liu H T, Kuo H C. Urinary nerve growth factor levels are increased in patients with bladder outlet obstruction with overactive bladder symptoms and reduced after successful medical treatment[J]. Urology, 2008, 72(1):104-108.
- 8 Kim J C, Kim D B, Seo S I, et al. Nerve growth factor and vanilloid receptor expression, and detrusor instability, after relieving bladder outlet obstruction in rats[J]. BJU Int, 2004, 94(6):915-918.
- 9 Chuang Y C, Fraser M O, Yu Y, et al. The role of bladder afferent pathways in bladder hyperactivity induced by the intravesical administration of nerve growth factor[J]. J Urol, 2001, 165(3):975-979.
- 10 Tyagi P, Banerjee R, Basu S, et al. Intravesical antisense therapy for cystitis using TAT-peptide nucleic acid conjugates[J]. Mol Pharm, 2006, 3(4):398-406.
- 11 Ku J H, Kim Y, Moon K C, et al. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer to bladder smooth muscle after bladder outlet obstruction in the rat: a morphometric analysis[J]. J Urol, 2006, 176(3):1230-1235.
- 12 Keay S. Cell signaling in interstitial cystitis/painful bladder syndrome[J]. Cell Signal, 2008, 20(12):2174-2179.
- 13 Erickson D R, Xie S X, Bhavanandan V P, et al. A comparison of multiple urine markers for interstitial cystitis[J]. J Urol, 2002, 167(6):2461-2469.
- 14 Ogawa T, Homma T, Igawa Y, et al. CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis[J]. J Urol, 2010, 183(3):1206-1212.
- 15 Svensson C I, Schafers M, Jones T L, et al. Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38[J]. Neurosci Lett, 2005, 379(3):209-213.
- 16 Ueda T, Tamaki M, Ogawa O, et al. Improvement of interstitial cystitis symptoms and problems that developed during treatment with oral IPD-1151T[J]. J Urol, 2000, 164(6):1917-1920.
- 17 Oguchi T, Funahashi Y, Yokoyama H, et al. Effect of herpes simplex virus vector-mediated interleukin-4 gene therapy on bladder overactivity and nociception[J]. Gene Ther, 2013, 20(2):194-200.
- 18 Funahashi Y, Oguchi T, Goins W F, et al. Herpes simplex virus vector-mediated gene therapy of tumor necrosis factor- α blockade for bladder overactivity and nociception in rats[J]. J Urol, 2013, 189(1):366-373.
- 19 Epperly M W, Defilippi S, Sikora C, et al. Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene[J]. Mil. Med, 2002, 167(2 Suppl):71-73.
- 20 Epperly M W, Gretton J A, DeFilippi S J, et al. Modulation of radiation-induced cytokine elevation associated with esophagitis and esophageal stricture by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (SOD2-PL) gene therapy[J]. Radiat Res, 2001, 155(1):2-14.
- 21 Kanai A J, Zeidel M L, Lavelle J P, et al. Manganese superoxide dismutase gene therapy protects against irradiation-induced cystitis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(6):F1304-1312.
- 22 Christ G J, Day N S, Day M, et al. Bladder injection of "naked" hSlo/pcDNA3 ameliorates detrusor hyperactivity in obstructed rats in vivo[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 281(5):R1699-1709.
- 23 Schrom F M, Moschall R, Schuch A, et al. Regulation of retroviral polyadenylation[J]. Adv Virus Res, 2013, 85(1):1-24.
- 24 Kreppel F, Kochanek S. Longterm transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors[J]. J Virol, 2004, 78(1):9-22.
- 25 Goncalves M A, van der Velde I, Knaan-Shanzer S, et al. Stable transduction of large DNA by high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors[J]. Virology, 2004, 321(2):287-96.
- 26 Bhatia S, Menezes M E, Das S K, et al. Innovative approaches for enhancing cancer gene therapy[J]. Discov Med, 2013, 15(84):309-317.

(收稿日期:2013-05-13)